





© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	1
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji sirup.....	4
Bibliografi.....	37
Tabel 1 - Syarat mutu sirup	1
Tabel A.1 - Ekuivalen natrium tiosulfat	7
Tabel A.2 - Faktor Fehling	10
Tabel A.3 - APM per 100 mL contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap pengenceran 10, 1,0, dan 0,1 mL/ 100 mL.....	24
Tabel A.4 - Reaksi biokimia <i>E. coli</i> pada uji IMVIC.....	26
Tabel A.5 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella sp.</i>	33
Tabel A.6 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella sp.</i>	33

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Sirup* ini merupakan revisi SNI 01–3544–1994 *Sirup*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan olahan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan produk industri sirup.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No.36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No.75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
8. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
9. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 67-04-S1 Minuman dan Tembakau yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 7 Oktober 2011 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 Februari 2012 sampai dengan tanggal 26 April 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Sirup

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, cara uji, pengemasan dan penandaan sirup.

2 Acuan normatif

Untuk acuan tidak bertanggal berlaku edisi terakhir (termasuk revisi dan atau amandemen)

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1 sirup

produk minuman yang dibuat dari campuran air dan gula dengan kadar larutan gula minimal 65 % dengan atau tanpa bahan pangan lain dan atau bahan tambahan pangan yang diijinkan sesuai ketentuan yang berlaku

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Gula dan air

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diijinkan untuk sirup sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diijinkan untuk sirup sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu sirup sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu sirup

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan:		
1.1	Bau	-	normal
1.2	Rasa	-	normal

Tabel 1 - Syarat mutu sirup (lanjutan)

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
2	Total gula (dihitung sebagai sukrosa) (b/b)	%	min. 65
3	Cemaran logam:		
3.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0
3.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
3.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
3.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
4	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5
5	Cemaran Mikroba :		
5.1	Angka lempeng total (ALT)	koloni/mL	maks. 5×10^2
5.2	Bakteri <i>Coliform</i>	APM/mL	maks. 20
5.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/mL	< 3
5.4	<i>Salmonella</i> sp	-	negatif/25 mL
5.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	negatif/mL
5.6	Kapang dan khamir	koloni/mL	maks. 1×10^2

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk sirup seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
- Cara uji total gula sesuai Lampiran A.3
 - Cara uji total gula metoda Luff Schoorl sesuai Lampiran A.3.1
 - Cara uji total gula metoda Lane dan Eynon sesuai Lampiran A.3.2
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.4
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.4.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.4.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.4.3
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.5
- Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.6
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.6.1
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.6.2
 - Cara uji bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.6.3
 - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.6.4
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.6.5

- Cara uji kapang dan khamir sesuai Lampiran A.6.6

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

9 Higiene

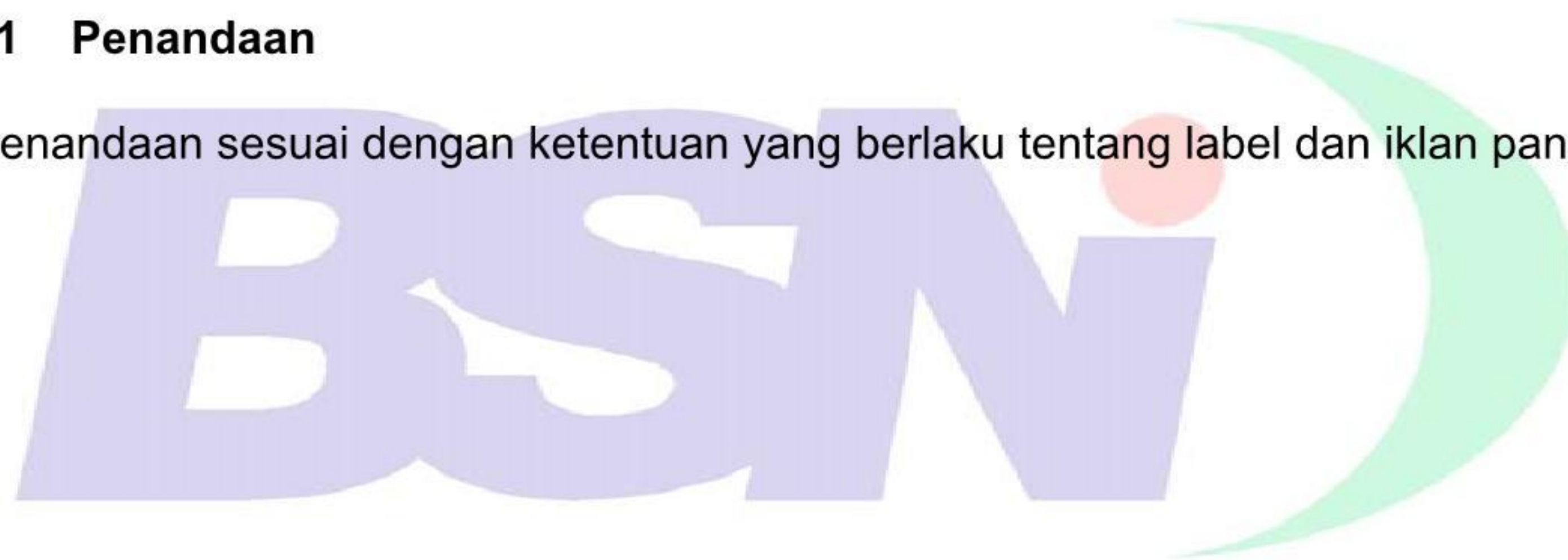
Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Sirup dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Penandaan

Penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji sirup

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan analisis kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan sirup secara aseptik dan ambil contoh sirup sebanyak 400 mL kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan sirup dan ambil contoh sirup.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan sirup dan ambil contoh sirup sebanyak 400 mL kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 Total gula (dihitung sebagai sukrosa)**A.3.1 Metoda Luff Schoorl****A.3.1.1 Prinsip**

Sukrosa dihidrolisis menjadi gula pereduksi. Jumlah gula pereduksi ditentukan dengan cara seperti pada penetapan kadar gula pereduksi. Hasil kali faktor kimia dengan kadar gula sesudah dan sebelum inversi menunjukkan kadar sukrosa.

A.3.1.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Penangas listrik;
- c) Penangas air;
- d) Pendingin tegak;
- e) Termometer terkalibrasi;
- f) *Stopwatch*;
- g) Erlenmeyer 500 mL;
- h) Pipet volumetrik 50 mL, 25 mL, dan 10 mL terkalibrasi;
- i) Labu ukur 1 000 mL, 250 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- j) Buret 50 mL terkalibrasi; dan
- k) Batu didih.

A.3.1.3 Pereaksi

- a) Larutan *Luff Schroorl*
 Larutkan 143,8 g Na_2CO_3 anhidrat dalam kira-kira 300 ml air suling, sambil diaduk tambahkan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dengan 50 ml air suling, tambahkan 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang telah dilarutkan dengan 100 ml air suling. Pindahkan larutan tersebut ke dalam labu 1 liter tepatkan sampai tanda garis dengan air suling dan kocok. Biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan Cu^{2+} 0,2 N dan Na_2CO_3 2 M.
- b) Larutan kalium iodida, KI 20 % ;
 larutkan 20 g kalium iodida p.a. dengan air suling hingga 100 mL.
- c) Larutan asam sulfat H_2SO_4 25 % ;
 larutkan 138 mL H_2SO_4 p.a. (98 %, b.j. 1,84) dengan 745 mL air suling.
- d) Larutan natrium tio sulfat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N ;
 - larutkan 100 mL larutan natrium tiosulfat 1 N dengan air suling bebas CO_2 menjadi 1 L;
 - pembuatan natrium tiosulfat 1 N;
 larutkan 248 g natrium tiosulfat 5 H_2O dengan air suling bebas CO_2 (yang sudah dididihkan terlebih dahulu) sehingga 1 L.
- e) Larutan asam klorida, HCl 25 % ;

- 640 mL HCl p.a. ($\pm 37\%$, b.j. 1,19) diencerkan dengan air suling hingga 1 L.
- f) Indikator kanji 0,5 % ;
larutkan 0,50 g amilum dengan air panas menjadi 100 mL.
 - g) Larutan natrium hidroksida, NaOH 30 % ;
 - h) Larutan indikator fenolftalin ;
 - i) Larutan Pb asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) setengah basa atau larutan Zn asetat ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ;
 - j) Larutan amonim hidrogen fosfat, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 % atau larutan kalium ferisianida ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ;

A.3.1.4 Cara Kerja

- a) Timbang seksama 2 g contoh (W) dan masukkan ke dalam labu ukur 250 mL, tambahkan air dan kocok;
- b) tambahkan 5 mL Pb asetat setengah basa dan goyangkan;
- c) teteskan 1 tetes larutan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %, bila timbul endapan putih maka penambahan Pb asetat setengah basa sudah cukup;
- d) tambahkan 15 mL larutan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %. Untuk menguji apakah Pb asetat setengah basa sudah diendapkan seluruhnya, teteskan 1-2 tetes $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 %, apabila tidak timbul endapan berarti penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10% sudah cukup;
- e) goyangkan dan tepatkan isi labu ukur sampai tanda garis dengan air suling, diamkan dan saring;
- f) pipet 50 mL hasil saringan ke dalam labu ukur 100 mL;
- g) tambahkan 10 mL HCl 25 %, pasang termometer dan lakukan hidrolisis di atas penangas air. Apabila suhu mencapai 68°C - 70°C suhu dipertahankan selama 10 menit tepat;
- h) angkat dan bilas termometer dengan air lalu dinginkan;
- i) tambahkan NaOH 30 % sampai netral (warna merah jambu) dengan indikator fenolftalin. Tepatkan sampai tanda tera dengan air suling, kocok 12 kali;
- j) pipet 10 mL larutan tersebut dan masukan ke dalam Erlenmeyer 500 mL;
- k) tambahkan 15 mL air suling dan 25 mL larutan Luff (dengan pipet) serta beberapa butir batu didih;
- l) hubungkan dengan pendingin tegak dan panaskan di atas penangas listrik. Usahakan dalam waktu 3 menit sudah harus mulai mendidih. Panaskan terus sampai 10 menit (pakai *stopwatch*). Angkat dengan segera dinginkan dalam bak berisi es (jangan digoyang). Setelah dingin tambahkan 10 mL larutan KI 20% dan 25 mL H_2SO_4 25 % (hati-hati terbentuk gas CO_2);
- m) titar dengan larutan tio 0,1 N (V_1 mL) dengan larutan kanji 0,5 % sebagai indikator; dan
- n) lakukan juga penepatan blanko dengan 25 mL larutan Luff. Kerjakan seperti di atas (V_2 mL)
- o) lakukan penetapan duplo; dan
- p) hitung sukrosa dengan menggunakan Tabel A.1

A.3.1.5 Perhitungan

$(V_2 - V_1)$ mL tio yang dibutuhkan oleh contoh dijadikan mL tio 0,1000 N kemudian dalam daftar (Tabel A.1) dicari beberapa mg glukosa yang tertera untuk mL tio yang dipergunakan (misalnya x mg).

Total gula dihitung sebagai sukrosa (%) = $0.95 \times \%$ gula sesudah inversi dengan:

$$\% \text{ gula sesudah inversi} = \frac{W_1 \times fp}{W} \times 100 \%$$

Keterangan:

- W_1 adalah bobot glukosa, berdasarkan Tabel A.1, dinyatakan dalam miligram (mg);
 Jumlah natrium tiosulfat 0,1 N yang diperlukan untuk mencari bobot glukosa dalam tabel adalah pengurangan volume titar blanko dengan volume titar contoh (V_2 sampai dengan V_1);
 V_2 adalah glukosa (yang dihasilkan dari daftar), dinyatakan dalam miligram (mg)
 fp adalah faktor pengenceran
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg)

A.3.1.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar total gula. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

Tabel A.1 - Ekuivalen natrium tiosulfat

Na₂S₂O₃ 0,1 M (mL)	Gula pereduksi Glukosa (mg)
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	14,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1
19	50,0
20	53,0
21	56,0
22	59,1
23	62,2

A.3.2 Metoda Lane dan Eynon

A.3.2.1 Prinsip

Sukrosa dihidrolisis menjadi gula pereduksi. Jumlah gula pereduksi seperti glukosa (dekstrosa), maltosa dan laktosa akan mereduksi larutan Fehling menjadi Cu_2O . Jumlah larutan gula yang mereduksi larutan Fehling ditentukan dengan cara titrasi, menggunakan metilin biru sebagai indikator untuk menentukan titik akhir titrasi. Hasil kali faktor kimia dengan selisih kadar gula sesudah dan sebelum inversi menunjukkan kadar sukrosa.

A.3.2.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas listrik;
- Penangas air;
- Termometer terkalibrasi;
- Labu ukur 100 mL dan 250 mL terkalibrasi;
- Erlenmeyer 300mL ;
- Buret 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 100 mL;
- Batu didih;
- Stopwatch;
- Pipet volumetrik 1 mL, 10 mL dan 50 mL terkalibrasi;
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 μm - 25 μm .

A.3.2.3 Pereaksi

- Larutan penjernih (*clearing agent*)
 - Kalium ferrosianida $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
 - Seng asetat $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - Asam asetat (CH_3COOH) glasial
- Pembuatan larutan penjernih
 - Larutan Carrez I
Larutkan 21,9 g $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam air yang mengandung 3 g asam asetat glasial, tepatkan sampai 100 mL dengan air suling.
 - Larutan Carrez II
Larutkan 10,6 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dalam air suling, tepatkan sampai 100 mL.
- Biru metilena 1 %
- Larutan Fehling
 - Fehling I : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - Fehling II
 - Na-K-tartrat
 $\text{COOK} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 - NaOH
- Pembuatan larutan Fehling
 - Fehling I
26,28 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan di dalam air suling sampai 1 liter.
 - Fehling II
346 g Na-K-tartrat ditambah 100 g NaOH dilarutkan dalam air suling sampai 1 liter.
 - Pada penggunaan larutan Fehling, campurkan larutan Fehling I dan Fehling II Dengan Perbandingan 1:1
- Kalsium Karbonat (CaCO_3)
- Asam Klorida, HCl 6,3 M
- Natrium Hidroksida, NaOH 6,25 M
- Kertas lakmus

A.3.2.4 Cara Kerja

- Timbang seksama 7 g - 8 g contoh contoh didalam gelas piala 100 mL, ditambah air suling secukupnya sampai larut;
- bila contoh mengandung asam, sebelum dilarutkan dengan air tambahkan 1 g CaCO_3 untuk mencegah inversi;
- bila contoh mengandung lemak, tambahkan larutan penjernih yaitu 5 mL larutan Carrez I dan 5 mL larutan Carrez II;
- setelah contoh larut, pindahkan ke dalam labu ukur 250 mL, tambah air suling sampai tanda garis, kemudian saring;
- pipet 100 mL larutan, pindahkan ke dalam labu ukur 250 mL, tambah air suling sampai tanda garis;
- pipet 50 mL larutan ke dalam labu ukur 250 mL;
- tambahkan 10 mL HCl 6,3 M dan air suling 25 mL, panaskan di dalam penangas air pada suhu 60°C , goyangkan selama 3 menit;
- biarkan labu ukur terendam di dalam penangas air selama 6 menit, dinginkan dengan segera;
- netralkan larutan dengan NaOH 6,25 M, tambah air suling sampai tanda garis;
- pipet 10 mL larutan Fehling, masukkan ke dalam erlenmeyer 300 mL, tambah beberapa butir batu didih;
- isikan larutan contoh ke dalam buret;
- alirkan 15 mL larutan contoh ke dalam gelas erlenmeyer yang berisi larutan Fehling, biarkan mendidih selama 1 menit di atas penangas listrik, tambahkan biru metilen 5 tetes, biarkan tetap mendidih sambil menambahkan larutan contoh dari buret tetes demi tetes sampai warna biru berubah menjadi oranye/merah. Catat jumlah mL larutan contoh;
- ke dalam erlenmeyer yang lain, pipet 10 mL larutan Fehling dari buret, tambahkan 2 mL kurang dari jumlah mL larutan contoh hasil titrasi di atas, dididihkan larutan selama 2 menit, tambah penunjuk biru metilen 5 tetes, lanjutkan titrasi sampai titik akhir titrasi dicapai.

A.3.2.5 Perhitungan

% jumlah gula pereduksi (dihitung sebagai gula inversi)

$$T = \frac{250}{V} \times \frac{W_1}{1000W} \times \frac{250}{100} \times \frac{250}{50} \times 100 \%$$

Keterangan:

- V adalah titer volume larutan contoh yang digunakan pada penitaran, dinyatakan dalam mililiter (mL)
 W_1 adalah bobot gula inversi (dari Tabel A.2), dinyatakan dalam miligram (mg)
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g)

$$\text{Kadar sukrosa} = 0,95 (T-X)$$

- T adalah % jumlah gula pereduksi (sesudah inversi)
 X adalah % gula pereduksi (sebelum inversi)

Tabel A.2 - Faktor Fehling

Titer Fehling (mL)	Invert (mg)	
	10	25
15	50,5	123,6
17	50,7	123,6
19	50,8	123,7
21	51,0	123,8
23	51,1	123,9
25	51,2	124,0
27	51,4	124,1
29	51,5	124,2
31	51,6	124,3
33	51,7	124,4
35	51,8	124,5
37	51,9	124,6
39	52,0	124,7
41	52,1	124,8
43	52,2	124,9
45	52,3	125,0
47	52,4	125,1
49	52,5	125,2
50	52,5	125,3

A.4 Cemarkan logam

A.4.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.4.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.4.1.2 Peralatan

- SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;

- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur kapasitas 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 mL - 100 mL;
- k) Botol *polypropylene*; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20-25 μm .

A.4.1.3 Perekasi

- a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) Larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19);
- c) Larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.4.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/ platina/ kuarsa (m);
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu $450 ^\circ\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol *polypropylene*;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

A.4.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah kandungan logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.4.2 Timah (Sn)

A.4.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.4.2.2 Peralatan

- SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Penangas air;
- Pemanas listrik;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 10 mL kapasitas 5 mL dan 0,1 mL terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur kapasitas 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

A.4.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat pekat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida pekat, HCl pekat;
- Larutan baku 1 000 µg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL asam HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.4.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan air suling dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh;

A.4.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.4.3 Merkuri (Hg)

A.4.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.4.3.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap dingin (*Cold Vapour*);
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm - 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL; dan
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;

A.4.3.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Batu didih;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- Larutan natrium molibdat 2 %.
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan NaBH_4 ;

- larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
 - Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
 - Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
Pipet 1 mL larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.
 - Larutan baku kerja Hg;
Pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.

A.4.3.4 Cara kerja

A.4.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.4.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO₃, 1 mL H₂O₂ kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh;

A.4.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.4.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.5 Cemaran arsen (As)**A.5.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As⁵⁺ direduksi dengan KI menjadi As³⁺ dan direaksikan dengan NaBH₄ atau SnCl₂ sehingga terbentuk AsH₃ yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

A.5.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Microwave digester* ;
- Labu Kjeldahl 250 mL;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Bunsen*;

- g) Pemanas listrik;
- h) Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Pipet volumetrik 25 mL;
- j) Cawan porselen kapasitas 50 mL;
- k) Gelas ukur 25 mL;
- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- m) Labu borosilikat berdasar bulat 50 mL.

A.5.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- c) Natrium boronhidrida, NaBH_4 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- d) Asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl 37 % kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- h) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- k) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.5.4 Cara kerja

A.5.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai 10 g contoh (m) kedalam labu Kjeldahl 250 mL, tambahkan 5 mL sampai 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;

- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangian setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL amonim oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0.1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.5.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0.1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.5.4.3 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times f_p$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

A.5.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.6 Cemarkan mikroba

A.6.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, Bakteri *Coliform*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, kapang dan khamir

A.6.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel minuman dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam minuman. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh minuman yang ditetapkan.

A.6.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Penangas listrik;
- Neraca kapasitas 2000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Labu erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet gondok steril 10,0 dan 1,0 mL terkalibrasi ;
- Tabung reaksi; dan
- Pisau, sendok, gunting, dan spatula steril.

A.6.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- | | |
|----------------------------|--------|
| - KH_2PO_4 | 34 g |
| - Air suling | 500 mL |

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigerator. Kemudian dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak (9 ± 1) mL dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.6.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.6.2 Angka lempeng total

A.6.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama (48 ± 2) jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.6.2.2 Peralatan

- Lemari pengering (inkubator) terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Alat penghitung koloni (*colony counter*);
- Penangas air;
- Cawan petri gelas/plastik diameter 15 mm x 90 mm steril; dan
- Pipet ukur 10 mL, 5 mL, dan 1 mL steril.

A.6.2.3 Pembenihan dan pengencer

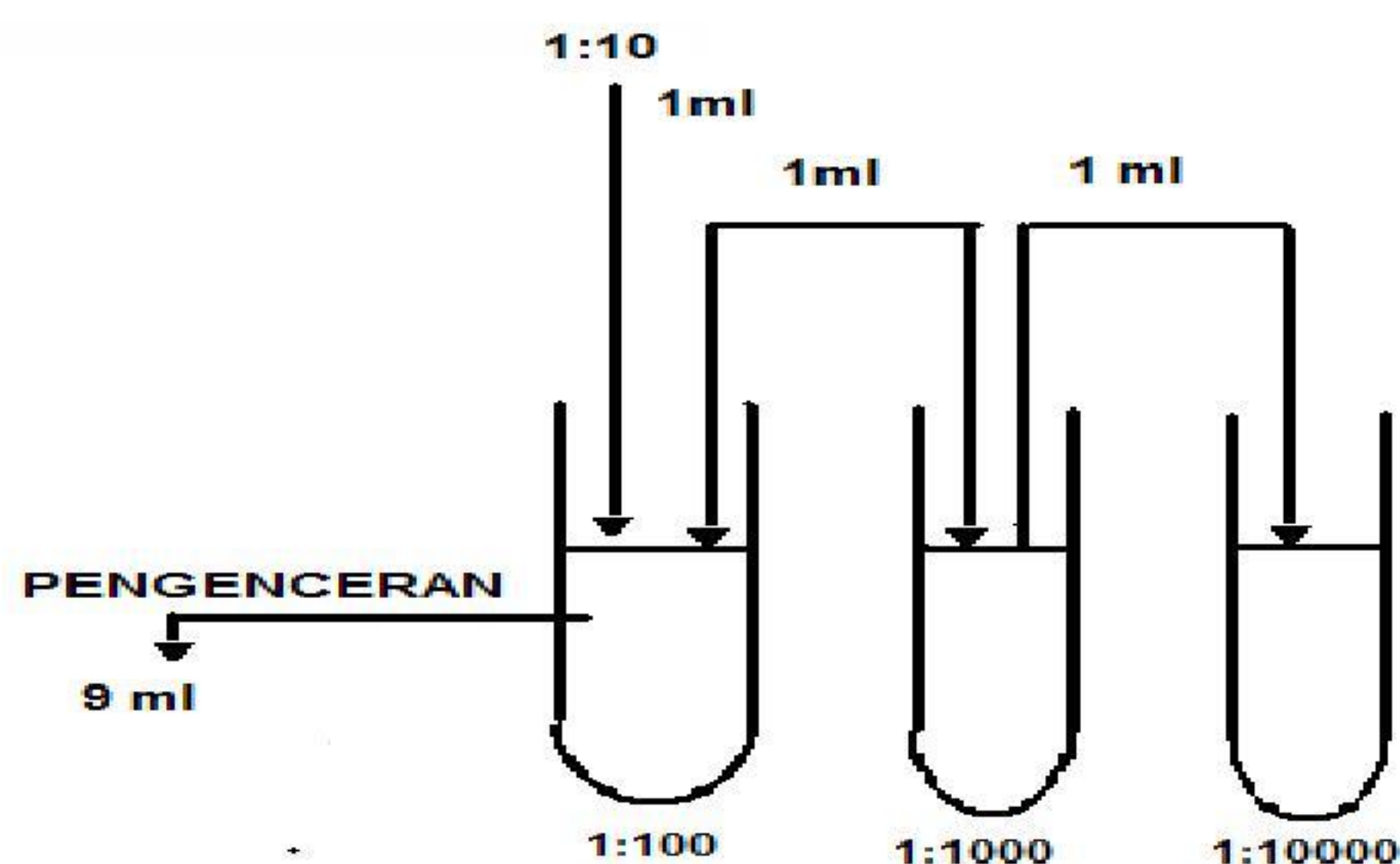
Plate Count Agar (PCA)

– Tryptone	5 g
– Yeast extract	2,5 g
– Glukosa	1 g
– Agar	15 g
– Air suling	1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

A.6.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);
- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate -Buffered Dilution Water* (BPB).

- c) tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu 36°C selama (48 ± 2) jam; dan
- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.6.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata - rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mililiter (koloni/mL);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.6.2.5 Pernyataan hasil

A.6.2.5.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per mililiter dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;
 d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 koloni, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni perambat;
- Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.6.2.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.6.3 Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli*

A.6.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.6.3.2 Peralatan

- a) Lemari pengering (inkubator), $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet Mohr 1 mL dan 10 mL berskala;
- e) Botol pengenceran (± 20 mL) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- f) Tabung reaksi;
- g) Tabung Durham;
- h) Cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril; dan
- i) Jarum ose (inokulasi), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.6.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LT) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;
- c) *Escherichia coli (EC) broth*;
- d) *Levine's eosin methylene blue (L-EMB) agar*;
- e) *Plate count agar (PCA)*;
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) *Pereaksi kovacs'*;
- i) *Merah metil – voges proskauer (MR – VP) broth*;
- j) *Pereaksi voges proskauer*;
- k) *Larutan merah metil*;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents 0,1 %*;
- n) *Pereaksi indol*;
- o) *Larutan kalium hidroksida 40 %*;
- p) *Buffer fields phosfat buffered dilution water*;
- q) *Larutan alpha naphthol 5%*; dan
- r) *Kristal kreatin*.

A.6.3.4 Cara kerja

A.6.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk bakteri *Coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.6.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

A.6.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *Coliform*

- Kocok tabung LST *broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* 2 % yang berlainan;
- masukkan tabung-tabung BGLB *broth* 2 % ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- catat semua tabung BGLB *broth* yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan Tabel A. 3, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB *broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35 °C; dan
- laporkan sebagai APM bakteri *Coliform* per gram.

Tabel A.3 - APM per 100 mL contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap pengenceran 10, 1,0, dan 0,1 mL/ 100 mL

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	2	0	29
0	2	0	6	2	2	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

A.6.3.4.3 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2)$ °C, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan “positif”;

- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke-(48 ± 2). Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif"; dan
- d) Lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.6.3.4.4 Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- a) Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- b) digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm;
- c) inkubasikan cawan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu (35 ± 1) °C;
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna hijau dengan atau tanpa kilat logam;
- e) dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang mencurigakan pada tabung agar miring PCA;
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C dan gunakan untuk uji selanjutnya;
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST untuk menegaskan adanya produksi gas;
 - pembentukan indol
 - Inokulasi tabung *tryptone broth* dari setiap tabung PCA;
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'; dan
 - uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - secara aseptis pindahkan 1 mL biakan ke dalam tabung reaksi steril;
 - tambahkan 0,6 mL larutan 5 % *alpha naphthol* dalam alkohol, 0,2 mL larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin, dan kocok;
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil
 - Setelah uji VP, inkubasikan kembali tabung MR-VP selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan
 - biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
 - penggunaan sitrat
 - Dengan hati-hati tabung *Koser's citrate broth* diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain,
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C, dan
 - adanya pertumbuhan dalam tabung yang ditunjukkan dengan warna keruh menandakan uji yang positif.
 - Pembentukan gas dari *lactose*
 - Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, dan
 - periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.6.3.4.5 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.4 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

Jasad	Indol	Merah metil	Voges Proskaeur	Sitrat
<i>Escherichia Coli</i>				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila IMVIC adalah ++-- atau -+-, pewarnaan gram menunjukkan gram negatif bentuk batang tidak berspora yang membentuk gas dalam LST broth dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C
- Apabila pada hasil uji IMVIC tidak diperoleh ++-- atau -+-, nyatakan hasil *E.coli* sebagai negatif/100 mL.

A.6.4 *Salmonella sp.*

A.6.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella sp.* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella sp.*

A.6.4.2 Peralatan

- Inkubator, (35 ± 2) $^\circ\text{C}$;
- Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator*, (4 ± 2) $^\circ\text{C}$
- Otoklaf;
- Oven;
- Penangas air, (49 ± 1) $^\circ\text{C}$;
- Penangas air, bersirkulasi, thermostat, ($43 \pm 0,2$) $^\circ\text{C}$;
- Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ($42 \pm 0,2$) $^\circ\text{C}$;
- Neraca, kapasitas 2 000 gram, dengan ketelitian 0,1 gram;
- Neraca, kapasitas 120 gram, dengan ketelitian 5 mg;
- Blender (10.000-12.000 rpm) dan blender jar steril;
- Botol bertutup ulir bermulut lebar 16 oz (500 mL) steril, Erlenmeyer 500 mL steril, *beaker*; 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 10 dan 5 mL dengan ketelitian 0,1 mL;
- Jarum ose (diameter ± 3 mm), *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- Tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- Botol pengencer 1 000 mL;
- Rak tabung reaksi atau rak tabung kultur;
- Vorteks mixer;
- Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);

- v) *Bunsen burner*;
- w) Kertas pH (kisaran pH 6-8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna;
- x) pH meter;
- y) Kantong plastik steril, 28-37 cm dapat diikat;
- z) *Beaker* plastik, 4 liter, dapat diotoklaf, untuk menyangga kantong plastik selama pengocokan dan inkubasi.
- aa) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril;

A.6.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Universal preenrichment broth*;
- b) *Tetrathionate (TT) broth*;
- c) *Rappaport-Vassiliadis (RV) medium* (*RV medium* harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi *RV medium* tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) *Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar*;
- e) *Hektoen enteric (HE) agar*;
- f) *Bismuth sulfite (BS) agar*;
- g) *Triple sugar iron (TSI) agar*;
- h) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- i) *Trypticase (tryptic) soy broth*;
- j) *Trypticase soy broth* dengan *ferrous sulfate*;
- k) *Trypticase soy-tryptose broth*;
- l) Merah metil-Voges Proskeaur (MR-VP) *broth*
- m) *Simmons citrate agar*;
- n) *Urea broth*;
- o) *Urea broth (rapid)*;
- p) *Malonate broth*;
- q) *Lysine iron agar (LIA)* (Edward dan Fife)
- r) *Lysine decarboxylase broth*;
- s) Medium uji motilitas (semi padat);
- t) Kalium sianida (KCN) *broth*;
- u) *Phenol red carbohydrate broth*;
- v) *Purple carbohydrate broth*;
- w) *MacConkey agar*;
- x) *Nutrient broth*;
- y) *Brain heart infusion (BHI) broth*;
- z) Larutan papain, 5 %;
- aa) Larutan selulosa, 1 %;
- bb) *Tryptose blood agar base*;
- cc) Bubuk kalium sulfit, anhidrat;
- dd) Larutan *chlorine*, 200 ppm, mengandung 0,1 % *sodium dodecyl sulfate*;
- ee) Etanol, 70 %;
- ff) Pereaksi Kovacs';
- dd) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- hh) Kristal *creatine phosphate*;
- ii) Larutan kalium hidroksida, 40 %;
- jj) Larutan natrium hidroksida 1 N;
- kk) Asam hidroklorat 1 N;
- ll) Larutan *brilliant green dye*, 1 %;
- mm) Larutan *bromcresol purple dye*, 0,2 %;
- nn) Indikator merah metil;
- oo) Air suling steril;
- pp) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);

- qq) Larutan *formalinized physiological saline*;
- rr) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- pp) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*;
- qq) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai;
- uu) *Salmonella Spicer-Edwards flagellar (H) antisera*;

A.6.4.4 Cara Kerja

A.6.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Pipet 100 mL contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 900 mL *universal preenrichment broth* steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 1 000 mL dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup, kemudian kocok perlahan;
- c) tambahkan 0,45 mL larutan *Briliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya $\frac{1}{4}$ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35°C .

A.6.4.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan kedalam 10 mL media *Rappaport-Vassiliadis (RV)* dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate (TT) broth* dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dan TT *broth* pada $(35 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi.

A.6.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
 - b) ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
 - c) inkubasikan cawan-cawan BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella sp.*;
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella sp.* dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella sp.* adalah sebagai berikut:
- | | |
|-----|---|
| XLD | : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan <i>Salmonella sp.</i> membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. |
| HE | : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan <i>Salmonella sp.</i> membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. |
| BS | : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media. |

- e) jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- f) dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu ($5 - 8$) °C;
- g) inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada bagian miring dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk H₂S pada agar miring LIA; Beberapa kultur non *Salmonella sp.* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella sp.* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada bagian miringnya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella sp.* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan asam pada bagian miringnya, dan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella sp.* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RV;
 - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 100 mL contoh minuman.

A.6.4.5 Identifikasi *Salmonella sp.*

A.6.4.5.1 Kultur campuran

- a) Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media *MacConkey agar*, *HE agar* atau *XLD broth*. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella sp.* :
 - *Mac Conkey agar*. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella sp.* akan membentuk area yang terang dari pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
 - *hektoen enteric (HE) agar*. Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;

- *xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar. Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA seperti pada pasal A.6.4.4.3.f dan lanjutkan seperti pada pasal A.6.4.4.3.g.

A.6.4.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dengan jarum inokulasi ke dalam *urea broth*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea Broth*. Inokulasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Reaksi *Salmonella* sp. yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

A.6.4.5.3 Pengujian kultur urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase* (LD) broth;
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan kedalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan
inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C yang amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung Durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung Durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
 - *Potassium cyanida* (KCN) broth
Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN broth. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiisi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
 - *malonate broth*
Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
 - uji indol
Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL kultur ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *kovacs'*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (tidak

terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

A.6.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
 - BHI broth, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *trypticase soy trypticase* (TST) broth dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL kultur di atas.
- b) siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan ± 0,5 mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.
 - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.6.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) *antiserum* ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*;
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.6.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel A.5 butir 1-11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 100 mL contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji

serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella sp.* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada pasal A.6.4.5.1 diatas dan uji kembali pada pasal A.6.4.5.2 Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.5 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung Durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung Durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;

Ikuti prosedur seperti pada pasal A.6.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* pada kultur yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) Merah metil-Voges-Proskauer (MR-VP) *broth*;

Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;

Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

 - Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam kedalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - Tambahkan 0,6 mL *alpha naphthol* dan aduk;
 - Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

 - Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- d) *Simmons citrate agar*.
 - Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil sitrat positif;
 - negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.6.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella sp.* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.5. Laporkan sebagai bukan *Salmonella sp.* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.6. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella sp.* pada uji

biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari pasal A.6.4.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.5 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	Glukosa (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN broth	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji indol	permukaan bewarna nila	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji Polyvalent flagellar	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji Polyvalent somatic	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji Voges-Proskauer	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	Uji merah metil	merah menyebar	kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:
^a+ adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari;
 - adalah 90% atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;
 V adalah variabel;
^b adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: negatif;
^c adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel A.6 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	Substrat uji	Hasil
1	Urease	positif (warna ungu-merah)
2	Uji indol dan polivalent flagellar (H) atau uji indol dan uji Spicer-Edwards flagellar	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)

Tabel A.6 (lanjutan)

No	Substrat uji	Hasil
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan KCN broth	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	KCN broth, uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan merah metil	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah uji <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		

A.6.5 *Staphylococcus aureus*

A.6.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase.

A.6.5.2 Peralatan

- Inkubator 35 °C;
- Oven;
- Spreader* steril dari gelas;
- Botol pengencer 500 mL;
- Tabung reaksi;
- Gelas ukur 10 mL dan 1 mL;
- Cawan petri;
- Gelas sediaan;
- Pipet ukur; dan
- Jarum ose/inokulasi.

A.6.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- Baird-parker* agar;
- Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- Plasma kelinci.

A.6.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.6.1;
- pipet masing-masing 0,3 mL; 0,3 mL; 0,4 mL larutan contoh dari setiap seri pengenceran ke dalam masing-masing ke 3 cawan petri yang berisi media BPA;
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh medium (\pm 10 menit). Jika contoh tidak mudah terserap oleh medium, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan

- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung tersangka koloni *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum ose.

A.6.5.5 Uji koagulase

- Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB);
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- tambahkan koagulasi plasma kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam kultur BHIB dan campur;
- inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam dan memeriksanya, setelah 6 jam akan terbentuk penggumpalan. Hanya bentuk yang kokoh dan sempurna serta dapat bertahan di dalam wadahnya ketika tabung dibalikkan disebut sebagai positif *Staphylococcus aureus*;
- amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- ratakan koloni (n) dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengenceranya; dan
- hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g contoh.

A.6.5.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) = $n \times F$

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/25 g) = $n \times F \times 25$

Keterangan:

n adalah jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.6.6 Kapang dan khamir

A.6.6.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu (25 ± 1) °C selama 5 hari.

A.6.6.2 Peralatan

- Inkubator (25 ± 1) °C terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air (45 ± 1) °C;
- Alat penghitung koloni;
- Mikroskop;
- Cawan petri 15 mm x 100 mm; dan
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL.

A.6.6.3 Pembenihan dan pengencer

Pilihan penggunaan media:

- Media dengan penambahan larutan antibiotik;
 - *Dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) agar;

- *Dichloran 18 % glycerol* (DG 18) agar;
- b) *Plate count agar* (PCA);
tambahkan 100 mg *chloramphenicol* per liter jika menggunakan media ini. Media ini tidak cocok jika diduga ada kapang menyebar (contoh *Mucor*, *Rhizopus* dll);
- c) *Malt agar* (MA);
- d) *Malt extract agar* (kapang dan khamir) (MEAYM); atau
- e) *Potato dextrose agar* (PDA):

- <i>Infusion from white potatoes</i>	200 g
- <i>Dextrose</i>	20 g
- <i>Agar</i>	20 g
- <i>Air suling</i>	1000 mL

 Larutkan semua bahan di atas. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 mL antibiotik (1 g/100 mL). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.
- f) Larutan antibiotik:
antibiotik ditambahkan dalam media kapang dan khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diotoklaf. Kandungan antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.6.6.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai A.6.1;
- b) terdapat dua metode persiapan media dalam cawan, yaitu :
 - metode menyebar pada cawan (untuk pilihan media DRBC dan DG 18):
pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebarkan merata dengan menggunakan batang gelas.
 - metode menuang pada cawan (untuk pilihan media DG 18):
pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri 15 mm x 100 mm dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media. Campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam dalam jangka 1 menit sampai dengan 2 menit.
- c) biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku;
- d) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- e) hitung koloni pada cawan sesudah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam. Jangan menghitung cawan-cawan sampai waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora; dan
- f) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang dan khamir per gram contoh;

A.6.6.5 Pernyataan hasil

A.6.6.5.1 Cara menghitung

Hitung cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

A.6.6.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Cara menghitung dan membulatkan angka kapang dan khamir seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada angka lempeng total.

Bibliografi

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 925.48, Sucrose in Sugars and Syrups, Polarimetric Methode Before and After Inversion with Hydrochloric Acid, 18th Edition, Chapter 44.1.09.*

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 923.09, Invert Sugar in Sugars and Syrups, Lane-Eynon General Volumetric Method, 18th Edition, Chapter 44.1.15.*

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method, 18th Edition, Chapter 9.1.01.*

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc. 18th Edition, Chapter 9.1.09.*

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercuri in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 18th Edition, Chapter 9.2.22.*

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 18th Edition, Chapter 9.2.35.*

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count.* Chapter 3.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria.* Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2007. *Salmonella sp.* Chapter 5.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Staphylococcus aureus.* Chapter 12.

SNI 7387:2009. *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.*

SNI 7388:2009. *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.*